

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08273

研究課題名(和文) 有棘細胞癌の新規癌幹細胞マーカーの探索

研究課題名(英文) A search for novel cancer stem cell marker of cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

武居 公子 (TAKEI, KIMIKO)

琉球大学・病院・助教

研究者番号：90325861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：有棘細胞癌(cSCC)モデル細胞株である低転移性株と、高転移性娘株の発現遺伝子を比較したところ、高転移性娘株ではより強い癌幹細胞形質の保持が示唆され、有力な新規候補分子としてRap2を見出した。ヒトcSCCを免疫染色したところ腫瘍に浸潤しているマクロファージ(TAM)にRap2発現が確認された。Rap2はRasの類縁分子で、A、B、Cのアイソタイプを持つ。マウス骨髄単球のMCSF刺激によりRap2B発現が増強した。マクロファージは炎症性(M1)と抗炎症性(M2)に大別され、TAMはM2型の性質を有し、腫瘍微小環境形成に関与すると考えられている。ノックアウトマウスを用いて更に研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rap2は癌遺伝子産物であるRasの類縁体でありながら、悪性腫瘍における機能の詳細は未だ不明である。今回、ヒト有棘細胞癌の腫瘍浸潤マクロファージにおけるRap2の関与を新規に見出した。Rap2の機能を制御することで根治切除困難な有棘細胞癌症例に対する新しい治療方法が開発出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pam212, a mouse keratinocyte cell line expresses Rap2, are non-metastatic. In contrast, metastatic derivatives of Pam212 cells expressed extremely low levels of Rap2. We have found that Rap2 is expressed in tumor invasive monocytes (CD68 positive) in SCC tissue specimens. Rap2 is Ras-like small G protein, and has three isotypes, Rap2A, Rap2B and Rap2C. Rap2B expression in murine bone marrow-derived cells was up-regulated by macrophage colony stimulation factor (MCSF). No difference in growth and morphology was found when bone marrow-derived cells from wild-type and Rap2B KO mice were stimulated by MCSF. There are two types of macrophages, inflammatory phenotype (M1) and regenerative phenotype (M2). Tumor associated macrophage (TAM) promote cancer metastasis like M2 by enhancing angiogenesis as well as tumor cell growth, migration and invasion. Rap2 function in TAM is under investigation using Rap2B KO mice.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：有棘細胞癌 TAM Rap2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚有棘細胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma: cSCC)は表皮由来の悪性腫瘍である。早期の外科的切除により多くは治癒するが、進行例では未だ確立した治療法はなく予後不良である。多様な分化段階の細胞から構成される悪性腫瘍は、その中に少数含まれる癌幹細胞が異なった増殖能や分化段階にある細胞を生み出すことによって不均一な腫瘍組織を形成するとされる。癌幹細胞は放射線や抗癌剤に耐性を持つことから、腫瘍の再発や転移には大きな役割を果たしていると考えられている。cSCCでも癌幹細胞の存在が示されているが、効率的にcSCC癌幹細胞を特定できる細胞表面マーカーや、cSCC癌幹細胞の性質を定義する遺伝子マーカーは未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、cSCCの術前評価や分子標的薬の創薬等、外科切除不能な進行例の治療法の開発に繋げるため、cSCCの癌幹細胞マーカーやその微小環境の性状を明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)材料

マウスcSCCモデル細胞株であるPam212(低転移親株、NIHのDr. Yuspaより分与)と高転移娘細胞株であるLY-1, LY-2, LY-8, LU-1 (NIHのDr. Chenより分与)を用いた。それぞれ10% FBS (Fetal Bovine Serum)入りのDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, D5796)培地でペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン0.2mg/mL存在下で5% CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養した。LLC細胞(RIKEN RCB0558)は10% FBS入りのDMEM(Sigma, D6046)培地でペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン0.2mg/mL存在下で5% CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養した。蛋白発現の検出には抗Rap2抗体(BD Transduction Laboratories 610215)、抗CD68抗体(BioLegend, 137001)、抗F4/80抗体(BioLegend, 123101)を使用した。マウスは8~12週齢のBalb/cマウスおよび8~12週齢のC57BL6/Jマウスを使用した。全ての動物実験は所属機関の規則に則り、委員会の承認を受けて行った。マウス骨髄細胞の分化誘導にgranulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF(Peprotech 315-03)およびmacrophage colony stimulating factor: M-CSF(Peprotech 315-02)を使用した。

#### (2)マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析

RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてcSCCの低転移細胞株と高転移娘細胞株より全RNAを抽出し、マイクロアレイによる発現遺伝子の解析を行い、候補遺伝子を選抜した。

#### (3)候補遺伝子の遺伝子発現解析

遺伝子発現は(2)と同様の方法で抽出した全RNAからcomplementary deoxyribonucleotide: cDNAを作成し(TaKaRa Primescript™ RT reagent with gDNA Eraser RR047A)、定量PCRで解析した。プライマー配列は以下の通りである。β-actin: 5'-cgtgaaaagatgaccagatca-3', 5'-tggtacgaccagagcctacacag-3', Rap2A: 5'-accagcagagcttcaagac-3', 5'-gttcccgaccagatgact-3', Rap2B: 5'-cggcaagcaaaagtttcaa-3', 5'-acagttgctcaggggaacc-3', Rap2C: 5'-atggccataccgagcagat-3', 5'-tgcaaccagggtgtaagtt-3'

#### (4)候補分子の蛋白発現解析

マイクロアレイで選抜された候補遺伝子やその関連分子の発現をウエスタンブロッティングで解析した。具体的には、低転移細胞株及び高転移娘細胞株を1x10<sup>6</sup>/6cm dishで撒き、3日間培養の後培地を捨て、1xPBS(-)バッファでリンスしたのち、セルスクレイパーで掻き取り15mL tubeに回収した。1,000回転、4°C、5分遠心して上清を捨てた後超音波破砕器でホモジナイズし、SDSバッファを加えて95°C、5分加熱したものをサンプルとして蛋白発現解析に供した。SDS化した蛋白サンプルを電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、各抗体でウエスタン解析し、ケミルミワン Super (Nakarai, 02230)で検出した。

#### (5)マウス骨髄細胞培養

8~12週齢のC57BL6/Jマウスの下肢骨から骨髄を採取し、セルストレイナーで細胞レベルにまで分散させた後、細胞を3群(無刺激、granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF刺激、macrophage colony stimulating factor: M-CSF刺激)に分け、1x10<sup>6</sup>/35mm dishで5~7日間培養し、細胞をマクロファージに分化させた後に回収し、全RNAおよび蛋白を抽出した。

(6)マウス皮下腫瘍接種

100mL の PBS に懸濁した  $1 \times 10^6$  の腫瘍細胞を 8~12 週齢のマウスの背部に皮下接種した。接種後 1 ヶ月間、連日~2 回/週腫瘍径を測定した。

(7)免疫組織化学

マウス皮下摂取腫瘍パラフィン包埋病理切片及びの 2004 年 1 月 1 日から 2022 年 3 月までに琉球大学病院を受診し、研究に同意が得られた cSCC 症例のパラフィン包埋病理切片を上記(1)の抗 CD68 抗体、抗 Rap2 抗体、抗 F4/80 抗体で免疫染色した。

4. 研究成果

(1) cSCC 高転移株では Rap2 発現が著減している

低転移株と高転移株の遺伝子発現を DNA チップで比較解析した。表 1 に高転移株で 16 倍以上の発現低下を示した遺伝子を示した。これらの中で、シグナル分子であることから Rap2 に注目した。Rap2 は癌遺伝子産物 Ras の類縁分子だが、癌における詳細な機能は不明である。

遺伝子レベルで発現が減少していたので、蛋白レベルでの解析も行った。Rap2 の発現は低転移株である Pam212 では発現しているが、高転移株である LY-1, LY-2, LY-8, LU-1 で著減していた。Rap1 は Rap2 と同様に癌遺伝子産物 Ras の類縁体であるが、Pam212 と LY-1, LY-2, LY-8, LU-1 細胞との間では同様の蛋白発現であった。上皮細胞の細胞間接着に重要な E-カドヘリンの蛋白発現も Pam212 と LY-1, LY-2, LY-8, LU-1 細胞の間では差がなかった(図 1)。cSCC の浸潤転移を含む悪性化に Rap2 の発現低下が関与している可能性があると考えた。

遺伝子名(略称)	発現比
Amical	28
Ccn1	21
Ces1	666
Commd2	21
Dusp22	29
Gfm1	38
Gmps	26
Gsta4	17
Hod	31
Hs3st1	16
Lxn	139
Rap2b	29
Schip1	51
Slco4a1	46
Ssr3	39
Tm4sf1	86
Wwtr1	42

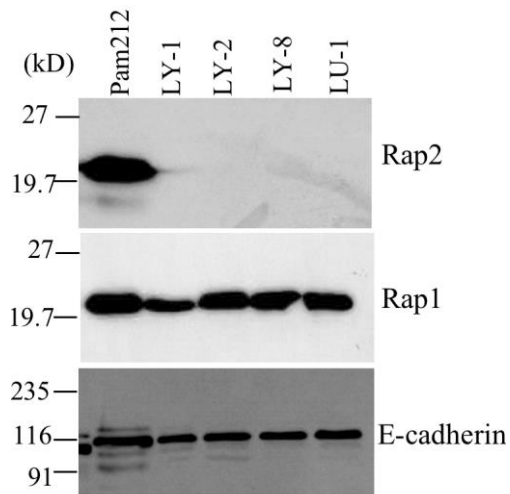


図1 高転移株でのRap2発現低下

表1 高転移株で16倍以上発現低下した遺伝子群

(2)高転移株に Rap2 を誘導してもマウス皮下接種腫瘍の増大に有意差はなかった。

cSCC の悪性化への Rap2 の関与を明らかにする為に高転移株である LY-1 に Rap2B 発現ベクターを導入し、Rap2B 発現 LY-1 細胞株を樹立した。対照株も併せて樹立し、培養下で両者の細胞形態や細胞増殖速度、細胞運動を比較したが有意差はなかった(データ非提示)。次に in vivo での増殖・転移能を解析する目的で Balb/c マウス背部皮下に Rap2B 発現 LY-1 細胞株と対照株を接種し、腫瘍生着や増

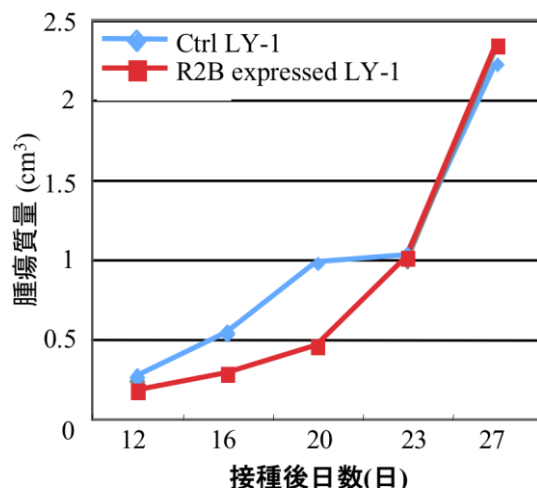


図2 Rap2B 発現 LY-1 と対照発現LY-1の腫瘍増大曲線

大速度を解析したが、両者に有意差はなかった(図2)。

(3)ヒト cSCC の腫瘍浸潤マクロファージには Rap2 が発現している

高転移株での Rap2B 発現誘導実験や Balb/c マウスでの腫瘍接種実験で有意差が認められなかったので、ヒト cSCC における転移例および非転移例で Rap2 発現を免疫組織化学で検討した。すると、転移例と非転移例の腫瘍細胞の Rap2 発現に差は見られなかったが、腫瘍に浸潤する免疫細胞に陽性所見が得られた。連続切片において Rap2 陽性細胞は単球の表面マーカーである CD68 陽性細胞と近接して染色され、両者は同一の細胞の可能性があると考えた(図3)。腫瘍に浸潤する単球に Rap2 が陽性である事を確かめる為に、Balb/c に接種した cSCC を Rap2 抗体とマウス単球マーカーである F4/80 抗体で2重染色した所、浸潤細胞で両者が共染する所見が得られた(データ非提示)。腫瘍に浸潤する単球は腫瘍関連マクロファージ(tumor associated macrophage: TAM)と呼ばれ、抗腫瘍免疫の抑制や腫瘍血管新生誘導を通して悪性腫瘍の進展に有利な環境形成に働くとされている。Rap2 は腫瘍関連マクロファージに発現することにより、腫瘍微小環境形成に機能している可能性があると考えた。

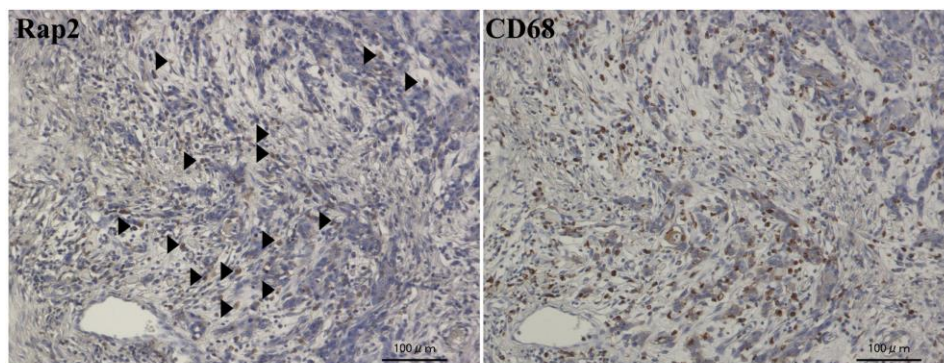


図3 Rap2はヒトcSCCに浸潤したCD68陽性単球細胞の多くに発現している

(4)マウス骨髄由来単球を M-CSF 刺激すると Rap2B の発現が増強する

腫瘍微小環境中のマクロファージは腫瘍傷害性に働く M1 型、腫瘍促進性に働く M2 型のサブセットを有するとされている。Rap2 が M1 型と M2 型のいずれのサブセットに発現しているのかを確かめる目的で、マウス骨髄由来単球を GM-CSF 及び M-CSF 存在下で培養し、マクロファージに誘導した。その結果、無刺激の骨髄細胞では Rap2 は殆ど発現していないが、GM-CSF 刺激下では Rap2 が少し発現増加し、M-CSF 刺激下では Rap2 発現が著増する

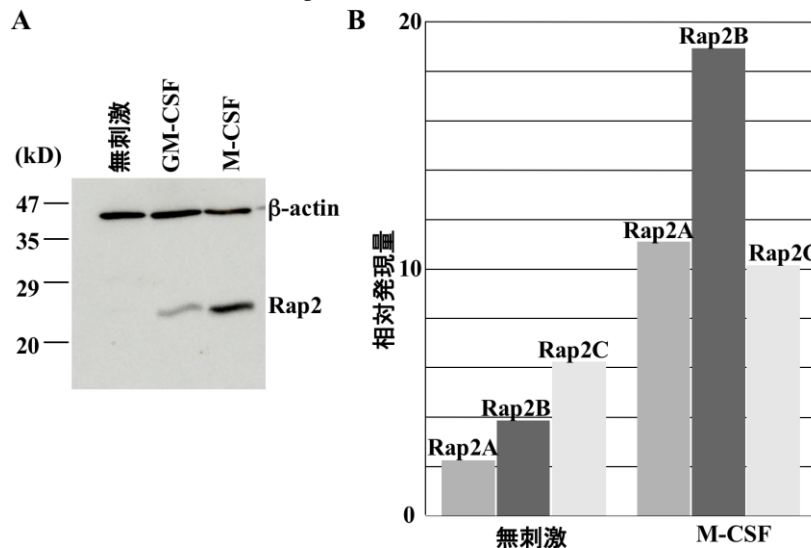


図4マウス骨髄由来単球をM-CSF刺激するとRap2発現が増強し、増強する主要なアイソタイプはRap2Bである。

A:ウェスタン解析 B: 定量PCR  
発現はβ-actinで標準化した。

その結果、無刺激の骨髄細胞では Rap2 は殆ど発現していないが、GM-CSF 刺激下では Rap2 が少し発現増加し、M-CSF 刺激下では Rap2 発現が著増する

ことがわかった。Rap2 には Rap2A, Rap2B, Rap2C の 3 つのアイソタイプがあるが、定量 PCR 解析の結果、M-CSF 刺激で発現増強する主要なアイソタイプは Rap2B であることが分かった(図 4A, 図 4B)。

(5) Rap2B KO マウス骨髄由来単球は M-CSF 刺激により正常に増殖分化する

マウス骨髄由来単球を M-CSF 刺激すると Rap2B の発現が誘導されることが分かったので、Rap2B KO マウスと野生型同胞マウスの骨髄由来単球の M-CSF 刺激によるマクロファージへの増殖分化を比較した。Rap2B KO マウス及び野生型同胞由来骨髄細胞は M-CSF によりいずれも正常に増殖分化した(図 5)。

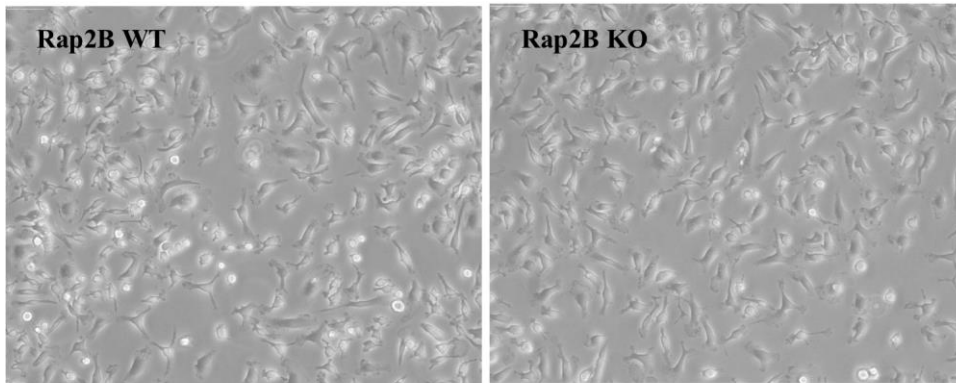


図5. マウス骨髄由来単球のM-CSFによるマクロファージへの分化。 Rap2B KOマウス由来単球および野生型同胞由来単球はいずれも正常に増殖分化した。

(6) Rap2B KO マウスでは腫瘍の増大速度が遅延する

Rap2B KO マウス及び野生型同胞の背部皮下に LLC 細胞を接種し、腫瘍増大速度を解析したところ、いずれも n=3 の先行実験ではあるが、Rap2B KO マウスでの腫瘍増大が有意に遅延した。Rap2B は TAM での発現を通して、腫瘍微小環境に影響している可能性がある(図 6)。現在、TAM において Rap2 が関与するシグナル経路を特定すべく解析を継続している。

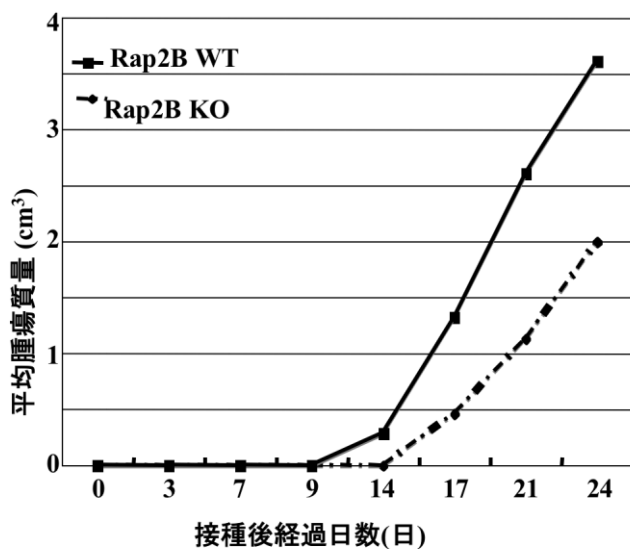


図6 腫瘍増殖曲線 Rap2B KOマウスでは野生型同胞と比較して腫瘍増殖が遅延した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kimiko Takei, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Ken-ichi Kariya
2. 発表標題 Functional analysis of Rap2 in tumor microenvironment
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	海川 正人  (UMIKAWA MASATO)  (00325838)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (18001)	
研究分担者	丸山 一郎  (MARUYAMA ICHIRO)  (70426568)	沖縄科学技術大学院大学・情報処理生物学ユニット・教授   (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------